

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-248579

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 H 21/02

C 0 7 H 21/02

21/04

21/04

B

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/566

G 0 1 N 33/566

審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-67321

(22) 出願日

平成9年(1997) 3月5日

(71) 出願人 591063394

財団法人東京都臨床医学総合研究所
東京都文京区本駒込3丁目18番22号

(71) 出願人 390037006

株式会社エスアールエル
東京都立川市曙町二丁目41番19号

(72) 発明者 小原 道法

千葉県東葛飾郡沼南町塚崎1308-19

(72) 発明者 井上 和明

神奈川県横浜市青葉区藤が丘二丁目41番43
号ガーデンプラザ205号

(74) 代理人 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定方法並びにそれに用いられるプライマー及びプローブ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 HCVの高感度、正確、かつ、簡便な測定手段の提供。

【解決手段】 特定された塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるフォワード側プライマー；上記とは異なる、特定された塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるリバース側プライマー；及び上記2配列とは異なる、特定された塩基配列のうち連続する15塩基ないし46塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドに、レポーター蛍光色素と、クエンチャー蛍光色素とが結合されているリアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるプローブ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるフォワード側プライマー。

【請求項2】 前記オリゴヌクレオチドは、配列表の配列番号2で示される塩基配列を有する20塩基から成る請求項1記載のプライマー。

【請求項3】 配列表の配列番号3で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるリバーズ側プライマー。

【請求項4】 前記オリゴヌクレオチドは、配列表の配列番号2で示される塩基配列を有する20塩基から成る請求項3記載のプライマー。

【請求項5】 配列表の配列番号5で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし46塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドに、レポーター蛍光色素と、クエンチャー蛍光色素とが結合されており、前記レポーター蛍光色素は、該レポーター蛍光色素が前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されている場合には蛍光共鳴エネルギー転移によりその蛍光強度が抑制され、前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されていない状態では蛍光強度が抑制されないものである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるプロープ。

【請求項6】 前記オリゴヌクレオチドは、配列表の配列番号6で示される塩基配列を有する26塩基から成る請求項5記載のプロープ。

【請求項7】 前記レポーター蛍光色素はフルオレッセイン系蛍光色素であり、前記クエンチャー蛍光色素はローダミン系蛍光色素である請求項5又は6記載のプロープ。

【請求項8】 請求項1又は2記載のフォワード側プライマーと、請求項3又は4記載のリバーズ側プライマーと、請求項5、6又は7記載のプロープとを用い、被検試料中の測定すべきHCV遺伝子を鋳型として逆転写PCRを行ない、反応液からの蛍光をリアルタイムに測定することから成る、被検試料中のHCV遺伝子の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、リアルタイム検出PCR法によるC型肝炎ウイルス（本願明細書において「HCV」という）の測定方法並びにそれに用いられるプライマー及びプロープに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来より、血清等の試料中のHCVの検

出は、逆転写PCR（RT-PCR）法により行なわれている。この方法は、(1) 血清からのRNA（HCV遺伝子はRNAである）の抽出、(2) 抽出したRNAを鋳型とするcDNA合成、(3) 1st PCRによる増幅、(4) 2nd PCRによる増幅（感度を上げるために増幅は2回行なう（nested PCR））、(5) アガロースゲル電気泳動、(6) データ処理という、6工程により行なわれている。また、このRT-PCR法とSouthern分析を組み合わせたRT-PCRSouthern法で被検RNAを定量することも可能である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 HCVのウイルス量を定量的に高感度で測定することは、単にウイルス感染の程度を知る以外にも治療経過のモニタリングを行なう上で重要である。しかしながら、上記のRT-PCR法では、被検試料中のHCVを検出できるものの定量することはできない。また、RT-PCRSouthern法は、工程が複雑で手間及び時間がかかる。HCVの測定は、主として臨床検査センター等で行なわれており、一定の時間内に多数の検体を処理する必要があることから、検査を効率化して検査時間を短縮することができれば非常に有利である。

【0004】 従って、本発明の目的は、HCVを高感度で正確に、かつ、簡便に測定する手段を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本願発明者らは、いわゆるリアルタイム検出PCR法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, pp.7276-7280, August 1991, Biochemistry; 特表平6-500021号公報）を用いてHCVの測定を行なうことにより上記目的を達成できるのではないかと考えた。しかしながら、用いるプライマー及びプロープの設定いかんによっては、測定の感度及び／又は再現性について必ずしも満足できない。そこで、鋭意研究の結果、特定のプライマー及びプロープを用いることによりリアルタイム検出PCR法を用いて非常に高感度に、高い再現性をもってHCVを正確に定量することができることを見出し、本発明を完成した。

【0006】 すなわち、本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるフォワード側プライマーを提供する。また、本発明は、配列表の配列番号3で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである、リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるリバーズ側プライマーを提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号5で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし46塩基から成る塩基配列を有

するオリゴヌクレオチドに、レポーター蛍光色素と、クエンチャー蛍光色素とが結合されており、前記レポーター蛍光色素は、該レポーター蛍光色素が前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されている場合には蛍光共鳴エネルギー転移によりその蛍光強度が抑制され、前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されていない状態では蛍光強度が抑制されないものである。リアルタイム検出PCR法によるHCV遺伝子の測定のために用いられるプロープを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のフォワード側プライマーと、上記

【0007】本発明のフォワード側プライマーは、配列表の配列番号1で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基、好ましくは18塩基ないし22塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。これらのうち、特に好ましいものとして、配列番号2に示される、20塩基から成る塩基配列を有するものを挙げる事ができる。なお、配列番号2で示される塩基配列は、HCVゲノムの第58番目のヌクレオチド（以下、「58nt」のように記載）～77ntに相当するものである。なお、HCVゲノムの全塩基配列は公知であり、Kato N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87:9524-9528 に記載されている。

【0008】本発明のリバース側プライマーは、配列表の配列番号3で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし40塩基、好ましくは18塩基ないし22塩基から成る塩基配列を有するオリゴヌクレオチドである。これらのうち、特に好ましいものとして、配列番号4に示される、20塩基から成る塩基配列を有するものを挙げる事ができる。なお、配列番号4で示される塩基配列は、HCVゲノムの294nt～313ntにハイブリダイズするものである。

【0009】本発明のプロープは、オリゴヌクレオチドに後述するレポーター蛍光色素とクエンチャー蛍光色素が結合したものである。該プロープのオリゴヌクレオチド部分は、配列表の配列番号5で示される塩基配列のうち連続する15塩基ないし46塩基、好ましくは24塩基ないし28塩基、から成る塩基配列を有する。該オリゴヌクレオチド部分の好ましい例として、配列番号6で示される26塩基から成るものを挙げる事ができる。なお、配列番号6で示される塩基配列はHCVゲノムの84nt～109ntに相当するものである。なお、プロープのオリゴヌクレオチド部分がハイブリダイズするHCV遺伝子の領域は、上記フォワード側プライマーがハイブリダイズする領域と近接して一部重複しているが、実際に反応を行なう場合には、フォワード側プライ

マーとプロープのハイブリダイズする領域が互いに重複することがない組み合わせを選択する必要がある。

【0010】前記レポーター蛍光色素は、該レポーター蛍光色素が前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されている場合には蛍光共鳴エネルギー転移によりその蛍光強度が抑制され、前記クエンチャー蛍光色素と同一のプロープに結合されていない状態では蛍光強度が抑制されないものである。レポーター蛍光色素としては、FAM（6-カルボキシフルオレッセイン）のようなフルオレッセイン系蛍光色素が好ましく、クエンチャー蛍光色素としては、TAMRA（6-カルボキシ-テトラメチルローダミン）のようなローダミン系蛍光色素が好ましい。これらの蛍光色素は公知であり、市販のリアルタイム検出PCR用キットに含まれているのでそれを用いることができる。レポーター蛍光色素及びクエンチャー蛍光色素の結合位置は特に限定されないが、通常、プロープのオリゴヌクレオチド部の一端（好ましくは5'末端）にレポーター蛍光色素が、他端にクエンチャー蛍光色素が結合される。なお、オリゴヌクレオチドに蛍光色素を結合する方法は公知であり、例えばNoble et al., (1984) Nuc. Acids Res. 12:3387-3403及びIyer et al., (1990) J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254に記載されている。

【0011】本発明の方法では、上記本発明のフォワード側プライマーと、上記本発明のリバース側プライマーと、上記本発明のプロープとを用い、被検試料中の測定すべきHCV遺伝子を鋳型として逆転写PCR（RT-PCR）を行ない、反応液からの蛍光をリアルタイムに測定する。このリアルタイム検出PCR法自体は公知であり、そのための装置及びキットも市販されているので、このような市販の装置及びキットを用いて行なうことができる。

【0012】反応は、被検HCVのRNA、上記フォワード側プライマー、リバース側プライマー及び上記プロープ並びに耐熱性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素活性をも有するもの）、dATP、dGTP、dCTP、dTTPを含む溶液を調製して行なう。dTTPに代えて、dUTPを用い、ウラシル-N-グリコシラーゼ（UNG）を加えることにより、前回のPCR産物からの混入DNAを分解することができるので好ましい。反応の具体的な条件は下記実施例に詳述されている。なお、被検試料としては、HCVを含有する疑いのあるいずれのものであってもよく、例えば血清等の体液である。HCVのRNAの調製は、従来のRT-PCRの場合と同様に行なうことができ、下記実施例にも具体的に記載されている。

【0013】反応では、まず、HCVのRNAを鋳型としてcDNAが合成され、次いで、このcDNAを鋳型としてPCRによりDNAの増幅が起きる。増幅DNAは、上記プロープと相補的な領域を含んでいるので、プロープは一本鎖状態の増幅DNAにハイブリダイズす

る。プローブが完全にハイブリダイズした状態で、プローブがハイブリダイズしている一本鎖DNAを鋳型とする伸長が起きると、DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性によりプローブが5'末端側から加水分解される。この分解の結果、プローブのオリゴヌクレオチド部分に結合されているレポーター蛍光色素とクエンチャー蛍光色素とがバラバラになり、クエンチャー蛍光色素に起因する蛍光共鳴エネルギー転移により抑制されていたレポーター蛍光色素からの蛍光強度が増加する。一方、被検試料中にHCVのRNAが存在しない場合には、DNAの増幅が起きないので、プローブはDNAにハイブリダイズせず、従ってDNAポリメラーゼによって加水分解されることもない。このため、レポーター蛍光色素からの蛍光は、クエンチャー蛍光色素により抑制されたままであり、蛍光強度は増加しない。従って、蛍光強度を測定することにより、被検試料中にHCVのRNAを検出することが可能である。

【0014】本発明の方法では、蛍光強度をリアルタイムに測定する。すなわち、蛍光強度を測定しながらPCR反応を行なう。測定される蛍光強度は、あるサイクル数を過ぎると検出限界を超え、急激に増加する。そして、被検試料中のHCVRNAの量が多いほど、少ないサイクル数で蛍光強度が急に増加する。従って、何サイクルを過ぎた時に蛍光強度の急激な増加が始まるかを調べることににより、被検試料中のHCVRNAの定量測定を行なうことができる。より具体的には、例えば、HCVRNAを含まないネガティブコントロールにおける各サイクル（例えば3～15サイクル）の蛍光強度の標準偏差の10倍を閾値として設定し、蛍光強度がこの閾値を超えるサイクル数を調べることににより、正確に被検試料中のHCVRNAを定量測定することができる。すなわち、被検試料中のHCVのRNA数の常用対数を横軸に、上記閾値を超えた時のサイクル数を縦軸にとると、測定結果はほぼ完全に直線上にのるので、検量線を作成

しておけば、何サイクルで閾値を超えるかを調べることににより被検試料中のHCVRNAの量を定量測定することができる。従って、本発明の方法によれば、従来のRT-PCRのように、PCR後に電気泳動を行なって増幅を調べる操作が不要であり、非常に簡便である。

【0015】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

10 【0016】実施例1

(1) プライマーの合成

配列番号2に示される20塩基から成る塩基配列を有する20merのオリゴDNAを化学合成し、フォワード側プライマーとした。また、配列番号4に示される20塩基から成る塩基配列を有する20merのオリゴDNAを化学合成し、リバース側プライマーとした。

【0017】(2) プローブの調製

配列番号6に示される26塩基から成る塩基配列を有する26merのオリゴDNAを化学合成した。このオリゴDNAの5'末端にFAMを、3'末端にTAMRAを上記文献記載の方法により結合し、プローブとした。

【0018】(3) 合成RNAの調製

HCV遺伝子の5'側領域を含むプラスミドであるpCII5(J. Virol. Vol. 66, p.1476-1483, 1992)を鋳型としてT7ポリメラーゼにより1762塩基のRNAを合成し、 5.04×10^7 から 5.04×10^9 コピー/ μ lまで10倍希釈系列を作製した。

【0019】(4) 反応液の調製

上記プライマー、プローブ及びPerkin Elmer TaqMan EZ RT-PCR Core Kit（商品名、Perkin Elmer社製）を用いて、反応チューブ1本あたり、下記表1に示す反応液を調製した。

【0020】

【表1】

成分	容量 (μ l)	終濃度
DEPC水	17.93	
5X TaqMan EZ Buffer A	10	1X
10 mM dATP	1	200 μ M
10 mM dGTP	1	200 μ M
10 mM dCTP	1	200 μ M
20 mM dUTP	1.25	500 μ M
15 μ M フォワード側プライマー	0.66	200 nM
15 μ M リバース側プライマー	0.66	200 nM
3 μ M プローブ	5	300 nM
rTth DNA ポリメラーゼ (2.5 U/ μ l)	3	7.5 U
AmpErase (商品名) UNG (1U/ml)	0.5	0.5 U
25 mM Mn(OAc) ₂	6	3 mM

【0021】(5) リアルタイム検出PCR
Perkin Elmer MicroAmp Optical Tube (商品名、Perkin Elmer社製) 1本あたり、上記反応液を48 μ l 加え、そこに上記被検血清由来RNA溶液2 μ l を添加した。20 キャップ (Perkin Elmer Optical Cap) をした後、ABI *

混入DNAのUNGによる分解反応
逆転写工程
UNGの失活
PCR

このPCRサイクルは53回繰り返した。

【0022】(6) 結果

サイクル数を横軸に、蛍光強度の変化を縦軸にとってプロットした結果を図1に示す。図1中、各線の近傍には、試料中のHCVのRNAのコピー数(試料は上記のように2 μ l 用いたので、上記濃度(コピー/ μ l)の2倍)の指数部分を示す。図1より、それぞれの被検試料について、ある一定のサイクル数を過ぎるまでは蛍光強度に変化は見られないが、あるサイクル数を過ぎると蛍光強度が急に増加することがわかる。そして、この蛍光強度の急激な増加が始まるサイクル数は被検試料中のHCVのRNAコピー数が大きいほど小さいことがわかる。また、上記リアルタイムPCRにおいて、HCVのRNAを含まない試料について行なったネガティブコントロールの3~15サイクルにおける蛍光強度の標準偏差の10倍を閾値とし、この閾値を超えたサイクル数(すなわち、蛍光強度が急激に増加し始めた時のサイクル数)を求めた。RNAコピー数の常用対数を横軸に、上記閾値を超えたサイクル数を縦軸にとってプロットした図を図2に示す。図2に示すように、RNAコピー数の常用対数と上記閾値を超えたサイクル数との間には直線関係があり(相関係数0.990)、上記サイクル数を測定することにより被検試料中のHCVのRNAを定量測定することが明らかになった。

*PRISM 7700 Sequence Detection System (商品名、Perkin Elmer社製) にセットし、以下の条件で反応を行なった。PCRの各サイクル毎に蛍光強度を測定しデータを収集した。

50℃、2分間
60℃、30分間
95℃、5分間
95℃、20秒間
60℃、1分間

※【0023】実施例2

(1) 被検HCV RNAの調製

C型肝炎患者の血清各200 μ l に、ISOGEN-LS(商品名、ニッポンジーン社製グアニジンチオシアネート系核酸抽出用試薬) 600 μ l (2ME 3 μ l、tRNA 10 μ g 添加) を加え、氷中に15分間静置した。160 μ l のクロロホルムを加え、氷中で15分間静置後、12000 x g で15分間遠心した。水相に等量のイソプロパノール及び1 μ l のグリコーゲンを加え、-20℃で1時間静置後、12000 x g で10分間遠心した。次いで、1 ml の75%エタノールで2回洗浄し、20 μ l のDTT・RNase 阻害剤加DEPC水で溶解し、測定まで-80℃で保存した。

40 【0024】実施例1と同じプローブ、プライマーを用い、実施例1と同じ組成の反応液を調製した。Perkin Elmer MicroAmp Optical tube 1本あたり、この反応液を45.5 μ l 加え、そこに上記被検血清由来RNA溶液4.5 μ l を加え、実施例1と同様に反応を行ない、各サイクル毎に蛍光を測定した。一方、従来のRT-PCR Southern法を利用した市販品(Amplicor (商品名)、Wolfe L., et al., New diagnostic tools, pp.83-94, 1994) 及びbDNA法(Lau JYN, et al., Lancet 1993;341:1501-1504) により、同じ被検試料についてHCV RNAのコピー数を測定した。結果を下記表2に示す。

※50

【0025】

検体番号	HCV RNA		
	Amplior (商品名) ($\times 10^3$ コピー/ml)	bDNA ($\times 10^3$ コピー/ml)	本発明 ($\times 10^3$ コピー/ml)
1	5.5	<0.5	867
2	950	15	66670
3	1400	5.6	77780
4	5300	7.4	77780
5	330	0.58	3778
6	9300	7.8	55560
7	5.9	<0.5	756
8	420	1.8	12220
9	<1.0	<0.5	<0.22
10	110	<0.5	3556
11	2	<0.5	24

【0026】表2に示されるように、本発明の方法による測定結果は従来法で得られた成績とよく相関し、かつ、高感度に測定できることが明かとなった。

【0027】

【発明の効果】本発明により、HCVを高感度で正確に、かつ、簡便に測定することが可能になった。

20* 【0028】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列

TGAGGAACTA CTGTCTTCAC GCAGAAAGCG TCTAGCCATG

40

※配列の型：核酸

【0029】配列番号：2

配列の長さ：20

配列

CTGTCTTCAC GCAGAAAGCG

20

★配列の型：核酸

【0030】配列番号：3

配列の長さ：40

配列

CCTCCGGGG CACTCGCAAG CACCCTATCA GGCAGTACCA

40

☆配列の型：核酸

【0031】配列番号：4

配列の長さ：20

配列

CACTCGCAAG CACCCTATCA

20

40◆配列の型：核酸

【0032】配列番号：5

配列の長さ：46

配列

AGCGTCTAGC CATGGCGTTA GTATGAGTGT CGTGCAACCT CCAGGA

46

*配列の型：核酸

【0033】配列番号：6

配列の長さ：26

配列

CATGGCGTTA GTATGAGTGT CGTGCA

26

※強度の変化の関係を示す図である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法により、各種被検血清中のHCVのRNAを測定した場合の、PCRのサイクル数と蛍光

【図2】各種被検試料についてHCVのRNAのコピー数の常用対数と、本発明の方法により被検試料中のHC

(7)

特開平10-248579

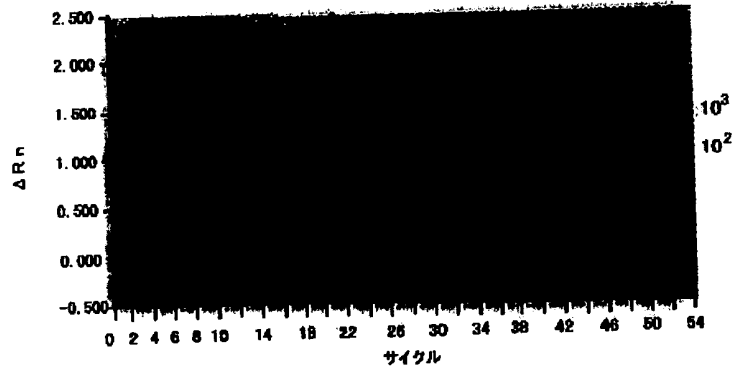
11

12

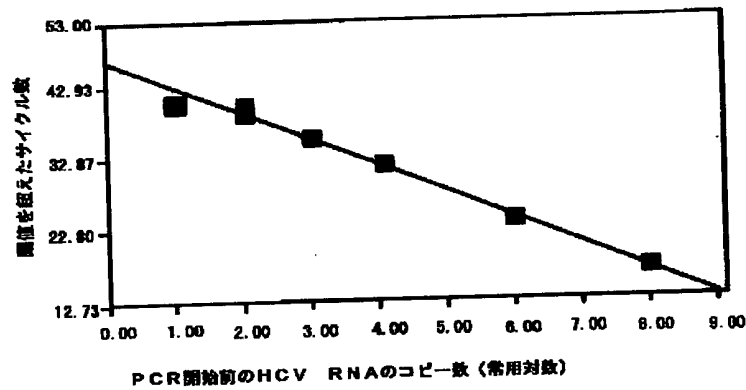
VのRNAを測定した場合における、蛍光強度の変化が

閾値を超えたサイクル数との関係を示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶
G 0 1 N 33/576

識別記号

F I

G 0 1 N 33/576

Z

(72)発明者 勝目 朝夫
埼玉県浦和市東仲町6-6ペルム浦和1001

(72)発明者 竹内 朋子
東京都杉並区和泉二丁目45番11号パークサ
イド波良303

(72)発明者 川口 竜二
東京都八王子市小宮町51 株式会社エスア
ールエル八王子ラボラトリー内